

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17348

基于 DNA 条形码技术对江门沿岸海域夏季鱼卵的鉴定

张楠¹, 吴娜^{1,2}, 郭华阳¹, 朱克诚¹, 刘永¹, 李纯厚¹, 杨静文¹, 江世贵¹, 张殿昌¹

1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 以江门沿岸海域夏季采集到的鱼卵研究对象, 利用 DNA 条形码技术分析鉴定鱼卵种类。本研究获得鱼卵个体有效线粒体 COI 序列信息 217 个, 测序成功率为 68.5%。经 BOLD 数据库比对分析, 成功鉴定鱼卵 5 目 14 科 19 属 20 种(未知种 2 种); 种内遗传距离为 0~0.006, 平均遗传距离为 0.002, 种间遗传距离为 0.149~0.325, 平均遗传距离为 0.255, 种间遗传距离为种内遗传的 128 倍; 鱼卵样品以鲈形目数量最多, 占 51.8%; 鲱形目次之, 占 24.8%; 其中鱼卵优势种为黄斑鲷(*Photopectoralis bindus*)、日本鳀(*Engraulis japonicus*)、大甲鲈(*Megalaspis cordyla*)、粗鳞鲈(*Chelon subviridis*)、金钱鱼(*Scatophagus argus*)、龙头鱼(*Harpodon nehereus*)、亚洲鱈(*Sillago asiatica*)。本次调查川山群岛东部海域获得鱼卵数量、鱼卵种类数均最多, 是江门沿岸海域日本鳀、龙头鱼的主要产卵场; 黄茅海、镇海湾西部水域均未获得鱼卵, 可能与水域环境变化及陆源污染导致产卵环境破坏、亲体量减少有关。该研究结果揭示了江门沿岸海域夏季鱼卵分布格局, 为其制定有效的产卵场保护措施提供依据, 同时表明 DNA 条形码技术能有效地对鱼卵进行种类鉴定, 可被广泛地应用于我国沿海海域鱼卵鉴定工作。

关键词: 鱼卵; 江门沿岸海域; DNA 条形码; mtCOI 序列

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0721-07

鱼卵是鱼类发育的最初阶段, 在海洋生态系统中, 鱼卵是主要的被捕食者, 是海洋食物链中的重要环节之一^[1]。鱼卵作为鱼类种群的重要补充来源, 其种类的分布和数量的增减是评估海域鱼类的产卵场, 亲鱼量和渔业系统补充量最直接有效的数据依据^[2-3]。因此, 鱼卵资源调查已成为海洋生态学及鱼类种群动态变化研究的科学基础^[4]。

由于鱼卵形态特征复杂多变, 用于鉴定的可识别特征少, 鱼卵分类鉴定研究通过传统方法遇到瓶颈^[1]。一直以来, 鱼卵种类鉴定的方法主要包括传统形态学鉴定、电子扫描技术、免疫学方法, 但传统形态学、电子扫描技术鉴定准确率低, 免疫学方法特异性抗体制备困难且费用较高等缺

陷^[5-6]。随着生命 DNA 条形码数据库的不断补充和完善, DNA 条形码技术已广泛应用于物种分类鉴定、生物多样性研究等^[7-9]。目前越来越多的科研工作者利用 DNA 条形码技术开展不同海域鱼卵、仔稚鱼的种类鉴定研究^[10-14]。结果证实, 基于细胞色素 C 氧化酶 I 基因(COI)的 DNA 条形码技术可以用于鱼卵、仔稚鱼的鉴定研究。

江门沿海海域(经纬度范围 21.38°N~22.02°N, 112.22°E~113.05°E)为亚热带海湾, 包括黄茅海、广海湾、镇海湾、川山群岛及周边海域, 海岸线长度 325 km, 海域面积 4621 km²。海域初级生产力旺盛, 生物资源种类丰富, 为众多经济鱼类的产卵场、索饵场、越冬场及洄游通道。近年来, 中国学者对江门沿岸海域渔业资源开展了少量的生

收稿日期: 2017-09-25; 修订日期: 2018-03-01.

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(2013FY110700); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2013A11); 农业部重大财政专项(NFZX2013); 国家科技基础条件平台建设运行项目(2017DKA30470).

作者简介: 张楠(1987-), 男, 助理研究员, 从事水产种质资源研究. E-mail: zhangnhs@163.com

通信作者: 张殿昌(1977-), 研究员, 从事水产种质资源研究. E-mail: zhangdch@163.com

态调查^[15],迄今未见关于江门沿岸海域鱼卵调查的相关报道。本文以 2016 年夏季江门沿岸海域捕捞的鱼卵样品为材料,应用 DNA 条形码技术对鱼卵进行分类鉴定,摸清了江门沿岸海域产卵区的物种组成和分布情况,为其渔业资源的保护和合理利用提供科学依据,为 DNA 条形码技术在鱼卵研究中应用积累科学资料。

1 材料和方法

1.1 样品采集

本研究以江门市重点海域和河口水域为对象,将海域分为四个区域:黄茅海水域、广海湾水域、镇海湾水域、川山群岛水域,共设计鱼卵采集站位 8 个(图 1),采样时间 2016 年 8 月 10 日,所有样品均采自同一航次,采用孔径为 0.505 mm 筛绢制成的网口直径 50 cm 浮游生物浅水网,按照设定站位进行表层水平和垂直拖网,取得活体鱼卵样品,−80℃ 冰箱中保存。

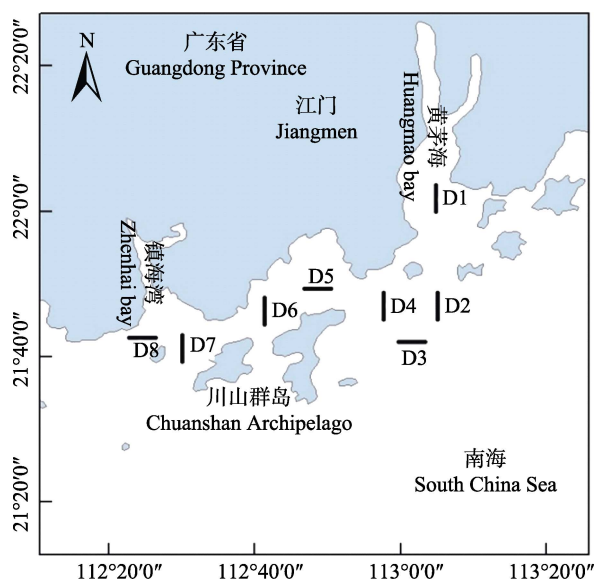


图 1 江门沿岸海域调查站位布设图

Fig. 1 Distribution of investigation stations in Jiangmen sea area

1.2 基因组 DNA 提取和扩增

观察拍照保存后的鱼卵样品用双蒸水进行冲洗,将样品置于 1.5 mL 离心管中,采用 Magen 公司的试剂盒(HiPure Gel Pure DNA Mini Kit)提取基因组 DNA,提取的 DNA 置于−20℃ 保存备用。mtCOI 序列扩增引物为 Fish-F: 5'-TCRACYAA-

YCAYAAAGAYATYGGCAC-3'和 Fish-R: 5'-AC-TTCWGGGTGRCCRAAGAATCA-3'^[16]。PCR 扩增总体积为 25 μL,反应体系包括 RNase-Free Water (16.7 μL)、10× Loading buffer (2.5 μL)、dNTP (2 μL)、MgCl₂ (1.5 μL)、Fish-F (0.5 μL)、Fish-R (0.5 μL)、r Taq (0.3 μL)及 DNA 模板(1.0 μL)。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物分别进行 1.2% 的琼脂糖胶电泳检测,选取扩增结果较好的产物送广州睿博兴科股份有限公司测序分析。

1.3 分析方法

1.3.1 DNA 条形码分析 利用 DNASTAR 软件包对序列进行校对,确定 mtCOI 序列准确性。测序获得的鱼卵 COI 基因序列与 BOLD 系统数据库比对分析进行物种鉴定^[17]。在比对分析中,BOLD 系统为每个样品分配一个条形码索引号(Barcode Index Number, BIN),当样品 COI 基因序列与 BIN 中参考序列的相似性 ≥ 98.4% 时,鉴定为种;当相似性在 95%~98.3%,鉴定到属;当相似性 < 95% 时,为未知种^[18]。利用 MEGA6.0 软件根据配对遗传距离采用 Kimura two-parameter model (K2P) 构建邻接进化树(neighbor-joining tree)^[19],进化树末端节点代表了种类分组。

1.3.2 优势度分析 鱼卵种类优势度采用以下公式计算^[20]:

$$Y = (N_i / N) \times f_i$$

式中, N_i 为第 i 种鱼卵数量, N 为所有种类鱼卵总数量, f_i 为第 i 种鱼卵在所有站位中出现的频率。本研究中取 $Y \geq 0.01$ 的种类为优势种^[21]。

2 结果和分析

2.1 种类组成与优势种

在调查江门沿岸海域 8 个站位中,黄茅海水域和镇海湾西部海域所设站位均未采集到鱼卵样品,中部海域 5 个站位(3 号、4 号、5 号、6 号、7 号)共计采集鱼卵样品 317 个(表 1),其中 4 号站位获得鱼卵样品最多,共计 90 个;其次是 6 号站位(86 个)和 3 号站位(56 个)。鱼卵样品根据其外部形态特征初步划分为圆形和椭圆形 2 种类型,其

中圆形鱼卵 236 个, 椭圆形鱼卵 81 个。通过基因组 DNA 提取、PCR 和测序分析, 有 217 个鱼卵个体获得了有效的线粒体 COI 序列信息, 测序成功率为 68.5%; 236 个圆形鱼卵中有 162 个测序成功, 测序成功率为 69.1%; 81 个椭圆形鱼卵中有 55 个测序成功, 测序成功率 67.9%。218 个鱼卵线粒体 COI 序列分别于 BOLD 数据库中比对分析, 结果显示与 BOLD 数据库中参考序列相似性在 95.1%~100%。189 个鱼卵样品精确鉴定到了种的水平(98.4%~100%), 种鉴定比率为 86.7%, 分属于 5 个目, 14 个科 19 个属 20 个种; 其余 28 个鱼卵样品均鉴定到属的水平, 其中 27 个鱼卵鉴定为舌鳎属(*Cynoglossus*), 1 个鱼卵鉴定为金线鱼属(*Nemipterus*)(表 2)。鱼卵样品以鲈形目数量最多, 占 51.8%; 鲱形目次之, 占 24.8%。

本次调查鱼卵优势种为黄斑鲷(*Photopectoralis bindus*)、日本鳀(*Engraulis japonicus*)、大甲鲈(*Megalaspis cordyla*)、粗鳞鲈(*Chelon subviridis*)、

金钱鱼(*Scatophagus argus*)、龙头鱼(*Harpadon nehereus*)、亚洲鳎(*Sillago asiatica*)。其中黄斑鲷优势度最高, 为 0.167; 亚洲鳎优势度最低, 为 0.015。不同站位所采集鱼卵种类数差异较大, 4 号站位采集鱼卵种类最多, 为 15 种; 其次是 7 号站位, 共采集 8 种鱼卵。采集鱼卵样品中, 黄斑鲷鱼卵数量最多, 为 61 个; 其次是日本鳀, 鱼卵 47 个。黄斑鲷鱼卵主要聚集在 6 号站位海域, 7 号、4 号站位较少分布, 其他站位未采集到其鱼卵。

表 1 不同站位鱼卵个体数统计表
Tab. 1 Statistics on the number of individual eggs in different stations

站位 location	卵/个 number of eggs	圆形卵/个 of spherical eggs	椭圆形卵/个 number of oval eggs
D3	56	56	0
D4	90	49	41
D5	31	26	5
D6	86	81	5
D7	54	24	30

表 2 江门海域鱼卵线粒体 COI 序列比对结果
Tab. 2 Sequence comparisons of mtCOI from the fish eggs gained in Jiangmen waters by BLAST method

物种名 species	卵/个 number of eggs	相似度/% similarity	属 genus	科 family	目 order
长棘银鲈 <i>Gerres filamentosus</i>	1	98.12	银鲈属 <i>Gerres</i>	钻嘴鱼科 Gerreidae	鲈形目 Perciformes
粗鳞鲈 <i>Chelon subviridis</i>	12	100	鲈属 <i>Liza</i>	鲈科 Mugilidae	鲈形目 Mugiliformes
金钱鱼 <i>Scatophagus argus</i>	12	100	金钱鱼属 <i>Scatophagus</i>	金钱鱼科 Scatophagidae	鲈形目 Perciformes
龙头鱼 <i>Harpadon nehereus</i>	8	100	龙头鱼属 <i>Harpadon</i>	合齿鱼科 Synodontidae	仙女鱼目 Aulopiformes
大甲鲈 <i>Megalaspis cordyla</i>	13	100	大甲鲈属 <i>Megalaspis</i>	鲈科 Carangidae	鲈形目 Perciformes
刺鲳 <i>Psenopsis anomala</i>	1	100	刺鲳属 <i>Psenopsis</i>	长鲳科 Centrolophidae	鲈形目 Perciformes
亚洲鳎 <i>Sillago asiatica</i>	8	100	鳎属 <i>Sillago</i>	鳎科 Sillaginidae	鲈形目 Perciformes
日本鳀 <i>Engraulis japonicus</i>	47	100	鳀属 <i>Engraulis</i>	鳀科 Engraulidae	鲱形目 Clupeiformes
日本竹筴鱼 <i>Trachurus japonicus</i>	4	100	竹筴鱼属 <i>Trachurus</i>	鲈科 Carangidae	鲈形目 Perciformes
刺公鳀 <i>Encrasicholina punctifer</i>	2	100	半棱鳀属 <i>Encrasicholina</i>	鳀科 Engraulidae	鲱形目 Clupeiformes
横纹九棘鲈 <i>Cephalopholis boenak</i>	1	100	九棘鲈属 <i>Cephalopholis</i>	鲈科 Serranidae	鲈形目 Perciformes
黄鲫 <i>Setipinna tenuifilis</i>	5	99.02	黄鲫属 <i>Setipinna</i>	鳀科 Engraulidae	鲱形目 Clupeiformes
黄斑鲷 <i>Photopectoralis bindus</i>	61	99.85	鲷属 <i>Leiognathus</i>	鲷科 Leiognathidae	鲈形目 Perciformes
细尾副叶鲽 <i>Alepes djedaba</i>	2	99.85	副叶鲽属 <i>Alepes</i>	鲈科 Carangidae	鲈形目 Perciformes
多鳞鳎 <i>Sillago sihama</i>	1	99.70	鳎属 <i>Sillago</i>	鳎科 Sillaginidae	鲈形目 Perciformes
深水金线鱼 <i>Nemipterus bathybius</i>	2	98.90	金线鱼属 <i>Nemipterus</i>	金线鱼科 Nemipteridae	鲈形目 Perciformes
红牙鲷 <i>Otolithes ruber</i>	1	99.84	牙鲷属 <i>Otolithes</i>	石首鱼科 Sciaenidae	鲈形目 Perciformes
双线舌鳎 <i>Cynoglossus bilineatus</i>	2	100	舌鳎属 <i>Cynoglossus</i>	舌鳎科 Cynoglossidae	鲱形目 Pleuronectiformes
玛丽双边鱼 <i>Ambassis marianus</i>	2	98.21	双边鱼属 <i>Ambassis</i>	双边鱼科 Ambassidae	鲈形目 Perciformes
尖头黄鳍牙鲷 <i>Chrysochir aureus</i>	4	100	黄鳍牙鲷属 <i>Chrysochir</i>	石首鱼科 Sciaenidae	鲈形目 Perciformes
金线鱼属 <i>Nemipterus</i> sp.	1	95.6		金线鱼科 Nemipteridae	鲈形目 Perciformes
舌鳎属 <i>Cynoglossus</i> sp.	28	95.1		舌鳎科 Cynoglossidae	鲱形目 Pleuronectiformes

2.2 系统进化分析

测序获得的 218 个鱼卵 COI 序列比对切齐, 保留共有序列, 长度为 604 bp。根据 K2P 模型计算鱼卵各分类阶元的遗传距离, 结果显示种内遗传距离为 0~0.006, 平均遗传距离为 0.002, 均低于 Hebert 提出的最大种内距离为 0.02 的标准。种间遗传距离为 0.149~0.325, 平均遗传距离为

0.255, 种间遗传距离为种内遗传的 128 倍, 符合种间距离要为种内距离 10 倍以上的要求, 因此 COI 序列可以作为鉴定鱼卵种类的条形码序列。基于 20 种鱼卵和 2 种未知鱼卵的 COI 序列构建的系统进化树如图 2 所示。所有鱼卵种类能够聚为独立分支, 同属物种均能聚集一起, 如鱈属亚洲鱈和多鳞鱈聚为一支, 金线鱼属未知种鱼金线

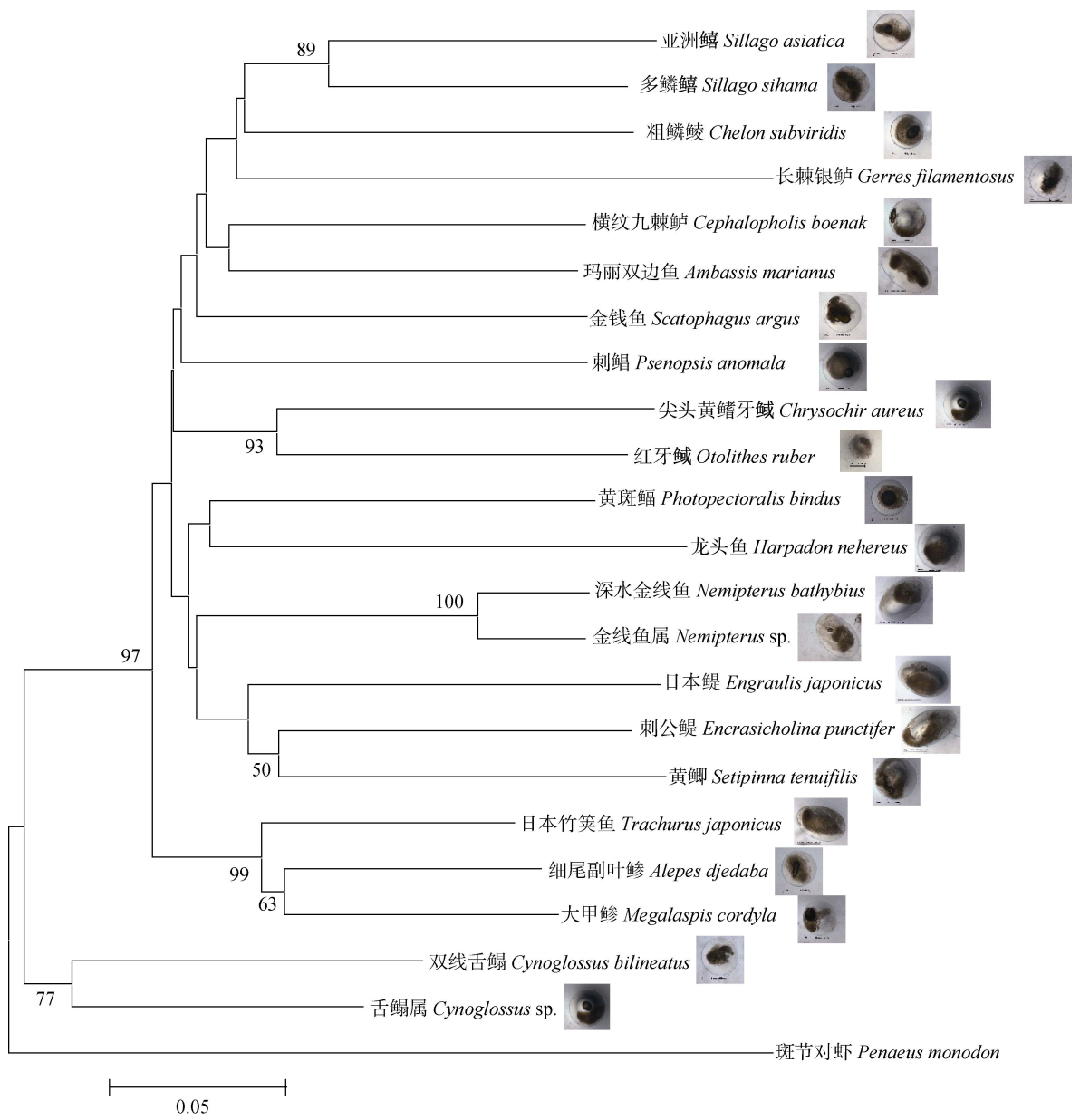


图 2 基于 COI 基因构建的系统进化树
节点上数字显示 1000 次重复的 bootstrap 验证分析中大于 50%支持率, 标尺代表遗传距离单位为 0.02/百万年。
Fig. 2 Neighbor joining tree resulting from analysis of COI gene data of egg species
Higher than 50% bootstrap value in 1000 replications are shown on branches.
The scale represents the genetic distance of 0.02/million years.

鱼聚一支, 舌鳎属未知种与双线舌鳎聚为一支。在科的分类单元中, 14 个科不同物种均能聚类, 如鲹科日本竹筴鱼、细尾副叶鲽、大甲鲽聚为一支, 鳀科日本鳀、刺公鳀、黄鲫聚为一支, 石首鱼科红牙鲷、尖头黄鳍牙鲷聚为一支。

3 讨论

本研究采用 DNA 条形码技术, 在种的水平上准确鉴定夏季江门沿岸海域鱼卵种类 20 种, 其种内平均遗传距离为 0.002, 而种间平均遗传距离 0.255, 种间遗传距离为种内遗传距离的 128 倍, 表明用 COI 基因进行鱼卵物种鉴定是可行的。在构建的系统进化树中, 所有物种都能聚为独立分支, 且以属、科作为分类单元均能在进化树上成功聚类, 说明 DNA 条形码技术能成功应用于鱼卵物种鉴定。DNA 条形码技术进行鱼卵鉴定, 其准确性取决于比对数据库的完整性和准确性。本研究中有 2 个鱼卵种类只鉴定到属的水平, 未能准确鉴定其种类, 主要由于 BOLD 数据库中没有高度匹配的参考序列。因此, DNA 条形码参考数据库的完整性直接影响到鱼卵鉴定的效率, 目前全球鱼类基因条码计划(Fish-BOL) 已经启动, 中国渔业生物 DNA 条形码研究工作紧跟步伐, 不断地补充和完善我国鱼类 DNA 条形码数据库信息, 为 DNA 条形码技术的开展物种鉴定研究提供数据基础。

本研究表明, 夏季川山群岛周围海域鱼卵资源相对丰富, 其东部海域鱼卵数量最多且鱼类种类多样性最高, 为优势种日本鳀、龙头鱼和舌鳎属鱼类主要产卵海域; 中部海域为优势种黄斑鲷、金钱鱼主要产卵海域。川山群岛作为我国第二大群岛, 属于典型的海洋群岛水域, 其周围海域受陆源污染和人类活动影响较少, 为鱼类产卵和仔稚鱼索饵提供了优质和安全的水生环境, 因此鱼卵资源量高于黄茅海和镇海湾海域。黄茅海属珠江口水系的出海口, 镇海湾有台山市和恩平市交界的小河流径流注入, 受淡水径流和沿岸上升流影响, 营养物质相对丰富, 理论上是理想的鱼类产卵海域。然而本次调查中黄茅海水域和镇海湾西部海域均未获得鱼卵样品, 其原因可能有

陆源污染物的输入、海水贝类养殖规模较大、海域污染的加剧、经济鱼类亲本量减少、产卵场生境遭到破坏等, 致使该海域不适宜鱼类产卵活动。刘霜等^[22]在黄河口及附近海域鱼卵和仔稚鱼种类和分布调查中发现, 受陆源污染影响, 莱州湾鱼卵仔稚鱼种类和数量显著下降, 优势种更替明显。因此, 需加强黄茅海、镇海湾海域生态环境的保护, 降低陆源污染, 合理规划养殖密度; 同时制定江门沿岸海域有效的产卵场保护措施, 保障其渔业资源的可持续利用。

本研究仍存在一些不足之处。首先部分鱼卵样品基因组 DNA 未能成功提取, 无法成功获得鱼卵条形码序列, 其原因可能是鱼卵样品为冰冻保存, 样品在冻融过程中降解, 导致其 DNA 无法提取; 或是由于鱼卵样品体积较小, 在 DNA 提取过程中操作不当导致样品损失。因此, 鱼卵样品保存和基因组 DNA 的提取需要进一步的优化, 提高鱼卵鉴定的检出率。另外, 本次江门沿岸海域调查季节为夏季, 对于其他季节各海域经济鱼类产卵情况尚不可知。因此, 可以增加不同季节调查航次, 更加全面地了解江门沿岸海域鱼卵分布和多样性现状, 更好为其制定有效的产卵场保护和划定策略提供理论依据。

参考文献:

- [1] Zhang R Z, Lu S F, Zhao C, et al. Fish Eggs and Larvae in China Offshore[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1985. [张仁斋, 陆穗芬, 赵传, 等. 中国近海鱼卵与仔鱼[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.]
- [2] Hu F. The species composition and quantity distribution of pelagic eggs, fish larvae and juveniles in the East China Sea region in spring 2003[J]. Marine Fisheries, 2004, 26(2): 79-85. [胡芬. 2003 年春季东海区浮性鱼卵和仔稚鱼种类组成及数量分布[J]. 海洋渔业, 2004, 26(2): 79-85.]
- [3] Yu W W, Liu P T, Tang J H, et al. Species composition and biomass distribution of fish eggs at inshore spawning site of Lvsu fishing ground[J]. South China Fisheries Science, 2011, 7(5): 9-17. [于雯雯, 刘培廷, 汤建华, 等. 吕四渔场近岸产卵场鱼卵的种类组成与数量分布[J]. 南方水产科学, 2011, 7(5): 9-17.]
- [4] Gao D K, Zhao J, Zhang X M, et al. Species composition and distribution patterns of ichthyoplankton within and outside artificial reefs in Laizhou Bay[J]. Journal of Fishery Sciences

- of China, 2014, 21(2): 369-381. [高东奎, 赵静, 张秀梅, 等. 莱州湾人工鱼礁区及附近海域鱼卵和仔稚鱼的种类组成与数量分布[J]. 中国水产科学, 2014, 21(2): 369-381.]
- [5] Shao K T, Chen K C, Wu J H. Identification of marine fish eggs in Taiwan using light microscopy, scanning electric microscopy and mtDNA sequencing[J]. Marine and Freshwater Research, 2002, 53(2): 355-365.
- [6] Gwo H H. Morphology of the fertilizable mature egg in the *Acanthopagrus latus*, *A. schlegeli* and *Sparus sarba* (Teleostei: perciformes: sparidae)[J]. Journal of Microscopy, 2008, 232(3): 442-452.
- [7] da Silva J M, Willows-Munro S. A review of over a decade of DNA barcoding in South Africa: a faunal perspective[J]. African Zoology, 2016, 51(1): 1-12.
- [8] Sheth B P, Thaker V S. DNA barcoding and traditional taxonomy: An integrated approach for biodiversity conservation[J]. Genome, 2017, 60(7): 618-628.
- [9] Paz A, Crawford A J. Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: a comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling of amphibians[J]. Journal of Biosciences, 2012, 37(5): 887-896.
- [10] Zhou M Y, Chen X, Yang S Y. Identification of several fish eggs and larvae by DNA barcoding in Xiamen Water[J]. Marine Environmental Science, 2015, 34(1): 120-125, 135. [周美玉, 陈骁, 杨圣云. 采用 DNA 条形码技术对厦门海域鱼卵、仔稚鱼种类的鉴定[J]. 海洋环境科学, 2015, 34(1): 120-125, 135.]
- [11] Steinke D, Connell A D, Hebert P D N. Linking adults and immatures of South African marine fishes[J]. Genome, 2016, 59(11): 959-967.
- [12] Leyva-Cruz E, Vásquez-Yeomans L, Carrillo L, et al. Identifying pelagic fish eggs in the southeast Yucatan Peninsula using DNA barcodes[J]. Genome, 2016, 59(12): 1117-1129.
- [13] Hofmann T, Knebelsberger T, Kloppmann M, et al. Egg identification of three economical important fish species using DNA barcoding in comparison to a morphological determination[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2017, 33(5): 925-932.
- [14] Pappalardo A M, Cuttitta A, Sardella A, et al. DNA barcoding and COI sequence variation in Mediterranean lanternfishes larvae[J]. Hydrobiologia, 2015, 749(1): 155-167.
- [15] Yan L, Tan Y G, Yang B Z, et al. Comparison on resources community of stow-net fishery before and after fishing off season in Huangmaohai Estuary[J]. South China Fisheries Science, 2016, 12(6): 1-8. [晏磊, 谭永光, 杨炳忠, 等. 基于张网渔业休渔前后的黄茅海河口渔业资源群落比较[J]. 南方水产科学, 2016, 12(6): 1-8.]
- [16] Ivanova N V, Zemlak T S, Hanner R H, et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(4): 544-548.
- [17] Ratnasingham S, Hebert P D N. BOLD: The Barcode of Life Data System ([http://www. barcodinglife. org/](http://www.barcodinglife.org/))[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(3): 355-364.
- [18] Ratnasingham S, Hebert P D N. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system[J]. PLoS ONE, 2013, 8(7): e66213.
- [19] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular biology and evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [20] Sun R Y. Principles of Animal Ecology[M]. (2nd edn). Beijing: Beijing Normal University Press, 1992. [孙儒泳. 动物生态学原理(第二版)[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1992.]
- [21] Lü Z B, Li F, Qu Y B, et al. Fish community diversity in the Huanghe estuary and its adjacent area in summer, 2010[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(2): 10-18. [吕振波, 李凡, 曲业兵, 等. 2010 年夏季黄河口及邻近海域鱼类群落多样性[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 10-18.]
- [22] Liu S, Zhang J M, Leng Y. Species and distribution characteristics of fish eggs and larvae at the Yellow River Estuary[J]. Marine Science Bulletin, 2011, 30(6): 662-667. [刘霜, 张继民, 冷宇. 黄河口及附近海域鱼卵和仔鱼种类组成及分布特征[J]. 海洋通报, 2011, 30(6): 662-667.]

DNA barcoding technology to identity spawn from the Jiangmen marine environment in summer

ZHANG Nan¹, WU Na^{1,2}, GUO Huayang¹, ZHU Kecheng¹, LIU Yong¹, LI Chunhou¹, YANG Jingwen¹, JIANG Shigui¹, ZHANG Dianchang¹

1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The main purpose of this study was to analyze and identify the species of fish eggs from the Jiangmen marine environment in summer, based on DNA barcoding technology. In the present study, we acquired a total of 217 effective mitochondrial COI sequences from fish eggs, and the success rate of sequencing was up to 68.5%. After the alignment of the BOLD database, we found that besides 2 species, a total of 5 orders, 14 families, 19 genera, and 20 species were identified. Statistical analyses showed that the interspecific genetic distances were 0~0.006, and mean interspecific genetic distance was 0.002, whereas the intraspecific genetic distances were 0.149~0.325, and mean intraspecific genetic distance was 0.255, which was 128-fold higher than the former. Among the fish eggs, the most abundant order was Perciformes (51.8%), followed by Clupeiformes (24.8%); the most abundant species was *Photopectoralis bindus*, followed by *Engraulis japonicus*, *Megalaspis cordyla*, *Chelon subviridis*, *Scatophagus argus*, *Harpadon nehereus*, and *Sillago asiatica*. In this investigation, the most abundant fish eggs were found in eastern Chuanshan Archipelago, both in numbers and species. The Chuanshan Archipelago is also known as the main spawning site of *H. nehereus* and *E. japonicus*. However, nearly no fish eggs were found in the Huangmao Bay area or western Zhenhai Bay, possibly owing to environmental disruption and a decrease of effective parent number, triggered by environmental variation and contamination from land-sourced pollutants. In general, we revealed the distribution pattern of fish eggs from the Jiangmen marine environment in summer, which provided a theoretical basis for developing effective protective measures for spawning sites. Meanwhile, the results also showed that DNA barcoding technology could be effective and broadly applied to identify the species of fish eggs in the marine habitats of our country.

Key words: fish eggs; Jiangmen marine environment; DNA barcoding; mtCOI sequence

Corresponding author: ZHANG Dianchang. E-mail: zhangdch@163.com